ICS 13.020
CCS Z00/09

T/SHSOT

团 体 标 准

T/SHSOTXXXX—XXXX

基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法

Integrated approaches for testing and assessment for skin corrosion and irritation based on reconstructed skin model

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布 XXXX-XX-XX 实施

上海市毒理学会 发 布

目　　次

前言.....II
1　范围.....3
2　规范性引用文件.....3
3　术语和定义.....3
4　符号和缩略语.....4
5　原理.....4
6　测试策略与评估过程.....7
7　数据和报告.....9
附录A（规范性）　皮肤刺激性测试方法.....10
附录B（规范性）　皮肤腐蚀性测试方法.....13
附录C（资料性）　参考物质表.....15

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任

本文件由上海市毒理学会提出并归口。

本文件起草单位：广州市华代生物有限公司，云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司，片仔癀（上海）生物科技研发有限公司，上海化工研究院，上海交通大学医学院，上海市疾病预防控制中心，无限极（中国）有限公司，欧莱雅研发创新中心，上海斯安肤诺生物科技有限公司，欧诗漫生物股份有限公司，上海微谱化工技术服务有限公司，沈阳沈化院测试技术有限公司，等。

本文件主要起草人：冯鉴鸿、程树军，等。

本文件首批执行单位：广州市华代生物有限公司，云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司，片仔癀（上海）生物科技研发有限公司，上海化工研究院，上海交通大学医学院，上海市疾病预防控制中心，欧莱雅研发创新中心，欧诗漫生物股份有限公司，沈阳沈化院测试技术有限公司，等。

基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法

1 范围

本方法适用于化学品的皮肤刺激性及腐蚀性的风险评价。
本方法适用于对化学品进行更准确的分类识别，用于更准确评估化学品潜在的皮肤危害。
本方法也适用于化妆品、农药、消毒产品等可能的皮肤接触物品的皮肤腐蚀性或刺激性的测试。
本方法规定了基于皮肤模型的整合测试策略的原则、内容、方法和技术要求。
本方法適用于的体外预测腐蚀性和刺激的IATA方法模块3-5

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

OECD GD 203, 2014. New Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation. No. 203. OECD, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD TG 431, 2019. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 431: In vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

OECD TG 439, 2019. OECD Guideline for Testing of Chemicals, no. 439: In Vitro Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

UN, 2017. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Rev. 7.

OECD (2020), Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), OECD Series on Testing and Assessment, No. 329, Environment, Health and Safety, Environment Directorate, OECD.

SN/T4577-2016化妆品皮肤刺激性检测重建人体表皮模型体外测试方法

GB/T27830-2011化妆品 体外皮肤腐蚀 人体皮肤模型试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。下列术语和定义适用于本文件。

3.1

皮肤腐蚀性

对皮肤造成不可逆损害的结果，既施用试验物质4小时内，可观察到表皮和真皮坏死。典型的腐蚀反应具有溃疡、出血、血痂的特征，而且在第14天观察结束时，皮肤、完全脱发区域和结痂处由于漂白而褪色。应通过组织病理学检查来评估可疑病变。

3.2

皮肤刺激性

皮肤局部化学品暴露4小时后的可逆性的损伤。皮肤刺激性是皮肤受到刺激后短期发生的局部的反应，通常是皮肤组织固有（非特异）免疫系统参与的局部炎症反应引起的。主要特征是可逆性的炎症反应过程，临床特征表现为与炎症过程相关的刺激性症状，如红斑、水肿、刺痛和疼痛。

3.3
定义性方法（define assay,DA）
由一组固定来源的数据和信息 (数据类型)加上一个解释数据的算法(数据解释过程)组成，通常作为毒性预测的一种方式。
3.4
未知或可变物质（Unknown or Variable composition,UVCB）
成分未知或可变的物质、复杂的反应产物或生物材料。
3.5
测试和评估的整合方法(Integrated assessment testing approaches, IATA)
指一个根据多种来源的信息用于化学品危害识别、危害特征描述和安全性评估的方法。
3.6
证据权重（weight of evidence, WoE ）
指采取综合的方法，解释和权衡源于IATA组件的多个证据链，其结果得出的结论可以用于决策。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。
4.1
C&L
分类和标识
4.2
OD_{ST}
测试组织的吸光度值。
4.3
KU
未处理的无活性组织
4.4
KT
测试物质处理的无活性组织
4.5
$OD_{ST-MTT1}$
未经MTT孵育的，用测试物质处理的重复活组织的组织1（已经用ODblank平均值校正）
4.6
NSC%
非特异颜色%。
4.7
TD &TK
毒性效力学（toxicodynamic,TD）和毒代动力学(toxicokinetic，TK)
4.8
PBK, physiologically based kinetic
基于生理的动力学
4.9
UPLC，Ultra Performance Liquid Chromatography
超高效液相色谱。

5 原理

5.1 整合测试策略原则

5.1.1 IATA 概念

测试和评估的整合方法(IATA)是一个根据多种来源的信息用于化学品危害识别、危害特征描述和安全性评估的方法。一个IATA整合并权重了所有相关的现有的证据，并在有需要时指导产生目标性的新数据，以指导关于潜在危害和风险的法规决策制定。IATA方案中，来自不同的信息源数据，如理化特征、计算机模型、分类方法和交叉参照方法、体外方法、体内试验和人的数据，进行评估和整合以得出关于化学品危害和风险的结论。这些信息来源通常包括不同的预测模型或体外方法。例如，计算机方法和体外方法用于预测试验动物的效应，正如动物试验传统上用于预测人体效应一样

5.1.2 定义性方法和判定性方法

应用IATA时应区分两类方法,基于规则的方法可以产生预测,被称为测试和评估的“定义方法”(DA)，而基于判定的方法较为灵活可以得到安全性的结论。DA由一组固定来源的数据和信息 (数据类型)加上一个解释数据的算法(数据解释过程)组成，通常作为毒性预测的一种形式。IATA的一个重要特性是需要明确地定义问题和使用场景，因为这些因素将决定方法的不确定性及其可接受水平、方法(组件)的选择和证据集成的方法。IATA内的不同组件需要加以区分，有一些元素原则上是可以被验证和标准化的(如DA方法)，而另外一些元素需要依靠专家判断，只能部分协调一致，例如，交叉参照方法。

5.1.3 证据权重

证据权重（WoE）是指采取综合的方法，解释和权衡源于IATA组件的多个证据链，其结果得出的结论可以用于决策。各种证据链的组成可以由现有的信息组成，以及由测试策略新生成的信息组成。在这种情况下，测试策略可能是现有的DA的组合，或者是基于初始的证据权重建立的专用的策略。新数据的生成和证据权重的应用是一个逐层迭代的过程，直到得出达到期望水平的确定性的结论。证据权重可以采用不同的方式进行，并且应当是以明确的和透明的方式，可以很容易地被跟进、重复和评审。

5.1.4 IATA组成来源

IATA的目的是评估来自于化学品暴露的人类健康和环境的风险，IATA是一个过程，运用全面的证据权重的方法，用以权衡和集成可以用到的化学品危害和暴露的信息和经验性数据。根据评估问题和保护目标，IATA的构建模块(组件)可以组装成不同的方式，可以包括一系列不同的方法和信息来源。IATA可以使用毒性效力学（toxicodynamic, TD）和毒代动力学（toxicokinetic，TK）信息。IATA中TD的信息可以来源于有害结局通路(AOP)，是指导致有害效应的生物学事件的结构化表示，并提供关于分子起始事件、关键事件和关键事件关系的机制性的信息。TK信息的来源包括体外方法以及计算方法，例如构效关系和PBK模型。

5.1.4.1 方法和信息源的类型

作为IATA输入的信息源是指任何来源的数据，不管实验获得或预测的，现有的或新生成的。既包括传统动物实验和新试验方法，也包括可以用于生成解释和集成数据的计算方法。体外方法包括各种不同类型的试验方法，可以根据试验的生物学基础进行分类，例如基于细胞培养体系的分类（如细胞检测和重建组织的检测），再比如基于方法的技术实现方式或底层支撑技术分类（如高通量筛选、高内涵筛选、高内涵成像、组学)。 体外方法还包括计算机方法，例如基于定量结构活性关系(构象)模型的方法，基于规则的和基于知识的预测模型,以及基于数学的动力学模型。多种数学技术可以用于开发计算机模型，如机器/深度学习的QSAR和其他基于规则的模型（如贝叶斯网络）。分类和交叉参照方法通常被归类为计算机方法，因为对化学品进行分类(根据毒理学相关标准)和填充数据缺口(通过从一个或多个类似物的属性“交叉互读”)的工作流通常需要使用计算机工具。

5.1.4.2 标准化和可接受水平

可以根据方法的被接受程度区分IATA中的组成方法，通常接受程度最高的是国际性的方法（如OECD健康效应中的测试准则、基于性能的测试指南方法或关于性能标准的方法）、国家标准、行业标准（如化妆品安全技术规范、原质检总局发布的检验检疫行业标准），其次是非准则和非标准方法，但可以在IATA内使用。定义性方法（DA）是标准化和依赖固定数据解释程序的，是构成IATA策略的主要方法，但IATA策略还要考虑证据权重和专家判断，必要时应当补充非标方法。

5.1.5 IATA的适用性

化学品和混合物均适用IATA评估。当用于混合物评估时，在组成模块的适用性上应考虑可用信息的数量，并且该适用性可能取决于每个评估个案的可用信息的质量。

5.2皮肤腐蚀性和刺激性的IATA方案

5.2.1 模块构成

皮肤腐蚀性和刺激性的IATA方案由三个部分8个模块组成（见表1）。第一部分是现有数据，可从文献和数据库以及其他可靠的来源获取有用信息，用于模块1到5。模块6理化性质中主要考虑pH值。模块7中包含有非测试方法，如用于化学物的(Q)SAR、交叉参照、分类和专家系统以及用于混合物的过渡性原则和可加性理论。第二部分包括模块8证据权重分析，如果WoE分析对潜在皮肤刺激性和腐蚀性具有不确定性，那么需要进行第三部分附加测试，优先采用体外方法，动物实验建议作为最后选择。

表1 皮肤刺激性和腐蚀性的IATA组成

组成*	模块	数据
第一部分 （现有信息，理化特性和非测试方法）		现有数据
	1	现有人体数据 a）局部皮肤效应的非标准化人体数据 b）人体斑贴测试
	2	动物实验皮肤刺激性和腐蚀性数据
	3	体外皮肤腐蚀性数据 a）大鼠皮肤电阻试验（OECD 430） b）皮肤腐蚀性膜试验(OECD 435) c）皮肤腐蚀性的重建表皮模型试验(OECD 431)
	4	皮肤刺激性的重建表皮模型数据(OECD 439)
	5	其他体内和体外数据 a）有效但未被认可的体外方法获得的皮肤腐蚀性或刺激性数据 b）其他体内和体外皮肤毒性数据
	6	理化性质（现有，测量或预测的） pH 值，酸/碱度值
	7	非测试方法 对于化学物：(Q)SAR，交叉参照，分类和预测系统 对于混合物：过渡性原则和可加性理论
第二部分（WoE分析）	8	证据权重(WoE)判定阶段和因素分析
第三部分 （附加测试）	(5b)	其他体内或体外皮肤毒性测试（如果其他监管需要）
	(3)	体外皮肤腐蚀性测试
	(4)	体外皮肤刺激性测试
	(5a)	未被国际权威机构认可的体外皮肤刺激性测试
	(2)	体内皮肤刺激性和腐蚀性测试

*当把三个部分考虑为一个整体顺序时，第一部分的模块1到7的顺序可以适当调整。

5.2.2 证据权重判定程序和分析

皮肤刺激性和腐蚀性IATA程序的主要目的是分类和标识(以&L)。采用WoE方法评估源于第一部分的信息。如果WoE确凿，那么可确定分类和标识。如果不确定，或者数据仍不可用，但可以参考另外一些相关监管机构的法规要求，则首先进行该法规要求的体内或体外皮肤毒性测试（模块5b）。一旦数据可

用，这些附加的测试结果应纳入新的WoE分析。如果WoE仍无法确定，则应当利用所有可用数据形成一种最大可能性的假设，用于指导后续试验的顺序，是自上而下法（top-down）还是自下而上法（bottom-up）进行。

5.2.3 证据权重的顺序

根据具体情况对每个可用信息进行权重分析，IATA中所包含模块的顺序并不等同于其重要性的先后。证据的相对优先顺序除了考虑数据的指示性作用外，还取决于个案中每个数据的质量。一般而言，当数据质量相等时，被监管认可的数据优先。模块中权重的相对优先顺序如下：

5.2.3.1 可靠的现有人体数据（特别是人体斑贴数据-模块1b）可作为最大的权重。

5.2.3.2 体内动物皮肤腐蚀性和刺激性数据（模块2）和体外皮肤腐蚀性或刺激性数据（模块3和4）考虑作为同等权重。

5.2.3.3 非测试方法（模块7），非标准化体内外和其他皮肤毒性数据（模块5）和理化性质（模块6）可作为作为较小权重。

5.2.4 证据权重分析过程

5.2.4.1 一般过程

检索现有资料，如果其直接与皮肤腐蚀性和刺激性相关，将分到模块1到4和5a中；将检索的其他体外和体内皮肤毒性数据的资料分到模块5b。因此，现有数据的检索可以采用逐步的方式进行：只有当模块1到4加上5a的信息无法对潜在皮肤刺激性和腐蚀性下结论时，才有必要对模块5b检索（第二次检索）。基于第一部分的部分信息，如模块1到7，某些情况下可以先进行简单的WoE，再考虑给出分步检索的建议：

5.2.4.2 如果已知评估的化学物具有极端pH值（结合高缓冲溶液的混合物），可以将该化学物定为腐蚀性，而不需要检索其他信息（模块1到5）。但是，如果要求进行腐蚀性的亚分类，那么需要进一步检索信息。

5.2.4.3 如果具有高质量人体斑贴数据（模块1b），并且体内或体外皮肤腐蚀性和刺激性没有可用数据时（模块2到5b），或者有数据且与人体斑贴结果一致时，那么没有必要进行模块5b到7的评估。

5.2.4.4 如果具有高质量的体内皮肤腐蚀性和刺激性数据（模块2）时，没有必要进行模块3到7的评估。

5.2.4.5 如果具有可靠的体外皮肤腐蚀性试验提示为潜在腐蚀性时，没有必要进行模块5到7的评估。

5.2.4.6 如果具有类似物的皮肤刺激性和腐蚀性资料，并且具有说服力的交叉参照（模块7）时，无需进行模块5和6的评估。

6 测试策略与评估过程

6.1 范围和策略

6.1.1 应用范围

基于表皮模型的体外预测腐蚀性和刺激的IATA方法主要用于模块3-5，当现有资料的证据权重分析不足以得出确定性的分类和标识时，作为一种实验步骤最优、获得结果最可靠的组合方式，用于测试物质准确的证据权利分析。具体可采用自下而上策略（即先进行皮肤刺激测试，再进行皮肤腐蚀测试）或自上而下策略（即先进行皮肤腐蚀测试，再进行皮肤刺激性测试）。

6.1.2 自下而上策略

在自下而上的策略中，采用体外皮肤刺激性测试（OECD TG 439，见规范性附录A）作为第一步。如果一种化学物质被识别为无刺激物，最终预测将为NC。否则，如果化学物质确定为刺激物，将使用体外腐蚀性测试（OECD TG431，见规范性附录B）作为第二步，如果化学物质确定为非腐蚀物，结合第一步的结果，最终预测为Cat2；如果化学物质确定为腐蚀性，最终预测为Cat 1或Cat1B/1C。

6.1.3自上而下策略

在自上而下的策略中，使用体外皮肤腐蚀性测试(OECD TG431，见规范性附录B)作为第一步。如果发现一种化学物质具有腐蚀性，最终预测结果为Cat 1A或Cat 1B/1C。否则，如果一种化学物质被识别为非腐蚀性，体外刺激性测试(OECD TG 439，规范性附录A)将被用作第二步。在此步骤中，如果一种化学物质被确定为刺激物，最终预测将为Cat2；如果一种化学物质被确定为无刺激物，最终的预测将为NC。

6.2皮肤模型的刺激性测试

实验过程见规范性附录A。

6.3皮肤模型腐蚀性测试

实验过程见规范性附录B。

6.4 干扰因素

6.4.1测试MTT还原剂

将每种测试化学品添加到新制备的四甲基偶氮唑盐（MTT）溶液中。如果含有试验化学品的MTT混合物变蓝/变紫，则认为试验化学品直接还原了MTT，应在无活性的重组人皮肤模型组织上进行进一步的功能检查。这种额外的功能检查采用了无活性的组织，这些组织仅具有残余代谢活性相似的方式吸收测试化学物质。将每种还原MTT的试验化学物质应用于至少两个无活性的组织复制品完成整个实验过程，以产生非特异性的MTT还原(NSMTT)。无论进行多少次独立测试/运行，单个NSMTT对照对于每种测试化学品都是足够的。然后计算真实的细胞活性，即活组织暴露于MTT还原剂时获得的组织生存力百分比减去死亡组织暴露于相同MTT还原剂时获得的非特异性 MTT 减少百分比，相对于校正试验同时运行的阴性对照计算(%NSMTT)。独立于使用标准吸光度测量或高效液相色谱/UPLC分光光度法程序。

6.4.2 识别有色化学品的测试

测试化学物与水或异丙醇接触时是否产生颜色，并决定是否需要额外的对照，应对水(暴露期间的环境)和/或异丙醇(提取液)中的测试化学品进行光谱分析。如果水和/或异丙醇中的试验化学品吸收570±30纳米范围内的光，则应进行进一步的着色剂对照，或者，应使用高效液相色谱/UPLC分光光度法程序，在这种情况下，不需要这些对照。进行标准吸光度(OD)测量时，将每种干扰性有色测试化学品应用于至少两个活组织复本，这些复本经过整个测试程序，但在MTT孵育步骤中用培养基而不是MTT溶液孵育，以产生非特异性颜色(NSCliving)对照。由于活组织固有的生物可变性，需要在测试有色测试化学品的同时进行对照组测试，如果进行多次测试，则每次测试(每批实验)都需要进行独立的对照测试。然后，将真实的细胞活性计算为活组织暴露于干扰试验化学品并与 MTT 溶液一起孵育所获得的组织存活率百分比减去活组织暴露于干扰。

6.4.3 检测方法的干扰

高效液相色谱/UPLC分光光度法也可用于所有类型的测试化学品(有色、非有色、MTT还原剂和非MTT还原剂)，以测量MTT甲臜。由于高效液相色谱/UPLC 分光光度法系统的多样性，在使用高效液相色谱/UPLC分光光度法系统对组织提取物中的MTT甲臜进行定量之前，应根据生物分析方法验证行业指南中描述的标准合格参数，满足一组标准合格参数的验收标准，从而证明该系统的合格性。

6.5方法性能和可接受标准

6.5.1 皮肤模型的可接受标准

6.5.1.1细胞活性

使用RhE模型进行的测试，其阴性对照组的实验结果需满足要求。阴性对照组的OD值的可接受范围由该模型的供应商建立。

6.5.1.2屏障功能：

角质层和其脂质组成需能够抵抗作为对照的有细胞毒性的化学品的快速渗透（例如，评估SDS的IC50）。IC50的可接受范围由供应商建立

6.5.1.3组织形态学

合格供应商应提供重建皮肤模型的组织学检查资料，以证明包含基底层、棘层、颗粒层和角质层的多层人类表皮样结构

6.5.2可重复性

试验方法使用者应使用阳性和阴性对照化学物质证明试验方法随时间推移的可重复性。

6.5.3 实验方法的可接受标准

每一批测试的阴性对照组的OD反应了该批模型经过包装、运输、接收及所有处理流程后的质量。对照组的OD值不能低于基于历史数据确定的界限。同理，阳性对照组（例如，5% SDS）反应了在该实验方法条件下模型对于刺激化学品物质的反应能力。复本组织间的可变性（例如，标准偏差SD）应在为所用试验方法建立的接受限度内。如果试验测试中包含的阴性或阳性对照组超出可接受的范围，则该轮试验

被视为不合格应重复进行。如果测试化学品的可变性超出规定范围，应增加重复测试。如果本轮测试化学品的复孔组织预测结果不一致，则需要增加第二轮测试，如果前两轮的预测结果不一致，则需要增加第三轮测试。

6.6 结果解释和预测模型

6.6.1 结果计算

将阴性对照组织的OD值设定为细胞活性100%。用每种试验化学品获得的OD值与阴性对照组织的OD值比对，计算百分比作为细胞活性。在使用高效液相色谱/UPLC 分光光度法的情况下，相对于同时使用阴性对照获得的MTT甲臜峰，细胞活性计算为暴露于试验化学品的活组织获得的MTT甲臜峰面积百分比。

6.6.2 皮肤刺激性预测

皮肤刺激性预测的临界值如下: 如果暴露和后培养后的平均组织细胞活性小于或等于(≤)50%，则根据UN GHS（Cat 1，Cat 2）试验化学品被确定为需要分类和标记。

6.6.3 皮肤腐蚀性预测

皮肤腐蚀性预测的临界值如下：如果暴露3min后的细胞活性小于（<）35%，则试验化学品被确定为腐蚀性Cat 1；如果暴露3min后的细胞活性大于或等于（≥）35%且暴露1h后的细胞活性小于（<）35%，或暴露1h后的细胞活性大于或等于（≥）35%且暴露4hr后的细胞活性小于（<）35%，则试验化学品被确定为腐蚀性Cat 1B/1C；如果暴露4h后的细胞活性大于或等于（≥）35%，则试验化学品被确定为非腐蚀性。

7 数据和报告

7.1数据

对于每次测试，来自单个复制组织的数据(例如，每种试验化学品的OD值和计算的细胞活性数据和分类)应以表格形式报告，包括适当的重复实验数据。此外，还应报告每次测试的标准差。对于每种测试化学品，应报告其是否与MTT有还原反应及是否为有色化学品。

7.2 实验报告内容

7.2.1测试化学品和对照化学物质:

单一成分物质:化学标识，如IUPAC或化学文摘社名称、化学文摘社编号、SMILES或InChI代码、结构式、纯度、适当和实际可行的杂质化学标识等；

多成分物质、UVCB 和混合物：尽可能识别单一化学品成分、定量，进行物理化学性质分析

物理外观、水溶性以及任何其他相关的物理化学性质；

来源、批号(如果有)；

测试前对测试化学品/对照化学物质的处理，如适用（如加温、研磨）；

测试化学品的稳定性、使用限制日期或重新分析日期(如果已知)；

储存条件。

7.2.2 使用的重建皮肤模型和实验方法(以及基本原理，如果适用)

测试条件: 使用的RhE型号(包括批号)；测量设备的校准信息(例如，分光光度计)，用于定量MTT甲臜的波长和带通(如果适用)以及测量装置的线性范围；描述用于量化MTT甲臜的方法；

高效液相色谱/UPLC分光光度法系统的资质说明(如果适用)；所用特定RhE模型的完整支持信息，包括其性能。

7.2.3 实验步骤

实验步骤的细节（包括暴露后的冲洗），测试化学物以及对照化学物质的浓度；暴露和后培养的时间及温度；MTT还原物或有色化学品的对照组的使用；试验化学品组或对照组使用的副本组织数量；使用的重建皮肤模型相应的预测模型及模型和实验方法的可接受标准；对于操作步骤的改动（包括冲洗）

7.2.4 结果

每一批实验的所有化学品及对照组的每个复孔组织的数据表格，包括OD值或MTT甲臜峰，细胞活性，平均细胞活性和SD；MTT还原剂或者有色化学品的对照组结果，如果适用；预测分类

7.2.5 结论

附　录　A 基于皮肤模型的皮肤刺激性测试方法

（规范性）

A.1　准备工作

A.1.1　检查重建表皮检测试剂盒（0d）

实验前应对待用于检测实验的重建表皮试剂盒进行检查，包括生产日期、批号等。检查试剂盒的pH值：试剂盒通常采用琼脂包埋便于运输，实验前应检查用于运输的琼脂的颜色，如果琼脂为橙色，可接受，如果琼脂颜色变黄或紫色，则pH值已发生改变，表明试剂盒不宜使用，应更换新的试剂盒。检查试剂盒的运输温度：如试剂盒在运输过程中配有温度试纸条，应检查温度试纸指示的颜色以确认试剂盒是否曾暴露于40℃的温度下，如颜色为灰白色，则试剂盒可接受，如颜色变为暗灰色则不能用于实验

A.1.2待测样品与MTT反应

用DPBS缓冲液配制浓度为3mg/mL的MTT的母液。将MTT母液用测试培养基稀释至0.3mg/mL。取一个新的12孔板，每种待测样品进行单孔实验（根据需测试样品的个数，确定使用的孔数）。每块12孔板准备一个对照孔（无待测样品）。每孔加入2mL 0.3mg/mL的MTT溶液，将10μL或10mg待测样品加入有MTT溶液的反应孔中，用移液器枪头混匀，将载有MTT溶液和样品的12孔板至于37℃，5%CO_2，95%相对湿度的CO2培养箱中，培养3h。3h后，从培养箱中取出，观察与对照孔相比是否有颜色变化，如果MTT溶液颜色变为蓝色或者紫色，说明待测样品与MTT反应，在之后的测试中需使用无活性组织对照组以去掉非特异性光密度值，若没有颜色变化，则无需使用无活性组织。

A.1.3模型接收

打开表皮试剂盒将表皮模型组织转移至含有2mL维持培养基的12孔板中，培养箱中孵育18-24h。

A.1.4 制备无活性组织

对可能与MTT具有相互作用的测试物质，应制备无活性表皮组织。用2mL超纯水代替培养基加入含活性表皮的培养孔板中，置培养箱中孵育24h，孵育结束后去除水分，制成无活性表皮组织。无活性表皮组织可在冰冻干燥条件（-18℃～-20℃）下保存6个月，使用前应室温解冻（2mL维持培养液中1h），解冻后组织的使用同活性组织。

A.2 实验步骤

A.2.1于12孔检测培养板3个孔中加入预温的维持培养液（2mL/孔）和表皮模型。加10μL或10mg未稀释的测试物质（或阳性或阴性对照）于表皮表面。每个组织处理之间至少间隔1分钟。在板盖上记录准确的时间安排。

A.2.2加样方式

液体测试物质：直接于每个表皮表面加10μL（26.3μL/cm^2）液体测试物质，使液体覆盖整个表面。固体测试物质：先均匀加5μL超纯水于表皮表面，然后加10±2mg（26.3mg/cm^2）固体粉末于表皮表面，必要时可用平底吸头轻轻涂抹均匀。黏性测试物质：将适当增加重量（12±2mg）的黏测试物质黏附于平底吸头，轻轻将黏性测试物质涂布于表皮表，保证涂布于表皮表面的测试的量达到10±2mg（26.3mg/cm^2）。

A.2.3　盖好培养板盖，室温下安全柜内保持作用15min。用镊子移出培养篮，用25mL无菌PBS完全冲洗培养篮，去除全部残留于表皮的测试物质。将培养篮置于吸水纸上，轻轻拍打从表面去除残留的PBS，必要时可用棉棒轻轻擦拭表皮。将暴露过的组织转移到预先加有新的维持培养液的培养孔中（第2列）。

培养箱中37℃孵育42±1h进行后培养，并记录时间。后孵育结束后进行MTT测试。将组织转移到含有2mL MTT溶液（0.3mgmL）的培养孔中。培养箱中37℃孵育180 min（±15 min)。

A.2.4　甲臜提取

准备2mL带盖EP管，标记；取出培养篮，用吸水纸将组织吸干；用打孔器取下表皮单位；用平头镊轻轻从胶原基质上取下并分离表皮组织，将表皮和支持胶原一起置于EP管内；在EP管内加入0.5mL 酸性异丙醇；盖紧盖子，防止挥发，混匀，确保所有生物材料浸没于溶剂中；室温或4℃下避光保存过夜；

A.2.5读数：

甲臜抽提结束后，涡旋混匀，静止2min。如果观察到悬浮可见的细胞或组织片段，则应离心（500r/min）去除，以避免对吸光值造成干扰；从每个EP管吸取2份200μL样品到96孔板中，即2×200μL样品/96孔（每个组织2个孔）；以酸化异丙醇为空白对照，在570nm处读96孔板OD值。

A.2.6计算各组OD值

空白（酸化异丙醇）：计算平均数，用于背景值校正。

阴性对照（D-PBS）：每个阴性对照组织的OD值减去空白平均值，将3个阴性对照组织的平均OD值确定为100%活性。

阳性对照（5%SDS）：每个阳性组织的OD值减去空白平均值，计算每个组织的平均值。

受试物：每个受试物组织的OD值减去空白平均值，计算每个组织的平均值。

通过与未处理的阴性对照相比，按以下公式计算每个干预表皮的活性百分比。

计算平均相对活性和活性的SD。

A.3结果计算

A.3.1 计算OD值

ODST=ODST raw－平均ODB

ODNC=ODNC raw－平均ODB

ODPC=ODPC raw－平均ODB

计算每块组织活性（%）

阳性对照活性（%）=（ODPC/平均ODNC）×100

测试物质活性（%）=（ODST/平均ODNC）×100

计算每组平均活性（%）

平均阳性对照活性（%）=（%PC1+%PC2+%PC3）/3

平均测试物质活性（%）=（%ST1+%ST2+%ST3）/3

注：ST为测试组织（substangce tissues）;NC为阴性对照（negative control）；
PC为阳性对照（positive control）；B为空白（black）。

A.3.2 MTT干扰物质的结果计算

干扰MTT的物质能产生非特异的MTT还原，因此必须计算非特异性的MTT还原值（non specific MTT reduction,NSMTT），并在计活性百分比前将其减去：NSMTT与阴性对照（活性组织）相比，NSMTT的值应当≤30%。如果阴性对照（活性组织）相比，NSMTT的值＞30%，需进一步实验或表明该物质不适用于本实验。将NSMTT转化为真实的MTT（true MTT metabolic conversion，TODST）：

TODST=ODTV－（ODKT－ODKU）

真实的细胞活性（%）=（TODST/ODNC）×100

注：TODST为测试物质处理组织的真实MTT（true MTT metabolic conversion）；

KU为未处理的无活性组织（untreated killed tissues）；

KT为测试物质处理的无活性组织（subsanct treated untreated killed tissues）；

TV为测试物质处理的活性组织（substance treated viable tissues）。

A.3.3 有颜色干扰物质的结果计算

在计算存活率％之前，应评估和减去与非特异性颜色相关的OD值。

非特定颜色％（NSC％）

ODST-MTT1：未经MTT孵育的，用测试物质处理的重复活组织的组织1（已经用ODblank平均值校正）

ODST-MTT：未经MTT孵育的经测试物质处理的重复活组织的平均OD（已用ODblank平均值校正）。

ODST-MTT1 = ODST-MTT1 raw － ODblank平均值

平均ODST-MTT = [ODST-MTT1 + ODST-MTT2 + ODST-MTT3] / 3

NSC%= 100 x [ODST-MTT / ODNC]

单个NSC（％）

组织1％NSC1 = 100 x [ODST-MTT1 / ODNC]

组织2％NSC2 = 100 x [ODST-MTT2 / ODNC]

组织3％NSC2 = 100 x [ODST-MTT2 / ODNC]

平均NSC（％）

%NSC =（%NSC1 +%NSC2 + %NSC3）/ 3

5%<NSC%≤30%

如果NSC%<5%，则使用常规计算模式

如果非特异性颜色（%NSC）相对于阴性对照>30%，需进一步实验或表明该物质不适用于本实验。

真正的MTT代谢转换（TCODST）

TCODST：对接受处理的组织的真实MTT代谢转化。

TCODST = [ODTV - ODCT]

最终存活率%TTNSC =（TCODST / ODNC）x 100

附　录　B 基于皮肤模型的皮肤腐蚀性测试方法

（规范性）

B.1准备工作

B.1.1　检查重建表皮模型试剂盒（0d）

实验前应对待用于检测实验的重建表皮试剂盒进行检查，包括生产日期、批号等。检查试剂盒的pH值：试剂盒通常采用琼脂包埋便于运输，实验前应检查用于运输的琼脂的颜色，如果琼脂为橙色，可接受，如果琼脂颜色变黄或紫色，则pH值已发生改变，表明试剂盒不宜使用，应更换新的试剂盒。检查试剂盒的运输温度：如试剂盒在运输过程中配有温度试纸条，应检查温度试纸指示的颜色以确认试剂盒是否曾暴露于40℃的温度下，如颜色为灰白色，则试剂盒可接受，如颜色变为暗灰色则不能用于实验。

B.1.2待测样品与MTT反应

用DPBS缓冲液配制浓度为3mg/mL的MTT的母液。将MTT母液用测试培养基稀释至0.3mg/mL。取一个新的12孔板，每种待测样品进行单孔实验（根据需测试样品的个数，确定使用的孔数）。每块12孔板准备一个对照孔（无待测样品）。每孔加入2mL 0.3mg/mL的MTT溶液，将10μL或10mg待测样品加入有MTT溶液的反应孔中，用移液器枪头混匀，将载有MTT溶液和样品的12孔板至于37℃，5%CO_2，95%相对湿度的CO_2培养箱中，培养3h。3h后，从培养箱中取出，观察与对照孔相比是否有颜色变化，如果MTT溶液颜色变为蓝色或者紫色，说明待测样品与MTT反应，在之后的测试中需使用无活性组织对照组以去掉非特异性光密度值，若没有颜色变化，则无需使用无活性组织。

B.1.3 模型接收

打开表皮试剂盒将表皮模型组织转移至含有2mL维持培养基的12孔板中，培养箱中孵育18-24h。

B.1.4 制备无活性组织

对可能与MTT具有相互作用的测试物质，应制备无活性表皮组织。

用2mL超纯水代替培养基加入含活性表皮的培养孔板中，置培养箱中孵育24h，孵育结束后去除水分，制成无活性表皮组织。无活性表皮组织可在冰冻干燥条件（-18℃～-20℃）下保存6个月，使用前应室温解冻（2mL维持培养液中1h），解冻后组织的使用同活性组织。

B.2 实验步骤

B.2.1 于12孔检测培养板加入测试培养液，2mL/孔。转移表皮模型至相应的12孔板中。阴性对照：50 μL NaCl溶液(9g/L)，暴露3个时间点。阳性对照：50 μL冰乙酸暴露240 min。

B.2.2 加样方式

液体或粘稠受试物：50 ± 3 μL(131.6 μL/cm2)；固体受试物：20 ± 2 mg (52.6 mg/cm2) +100 μL±5μL NaCl溶液 (9g/L)；蜡状受试物: 50 ± 2 mg (131.6mg/cm2) 尼龙膜；盖好培养板盖，室温下（18-28℃）安全柜内暴露3个时间点：3 min、 60 min (±5 min)、和240 min (±10 min)。阳性对照只进行240min暴露。到达规定的暴露时间，用镊子移出培养篮，用25mL无菌PBS完全冲洗培养篮，去除全部残留于表皮的受试物。将培养篮置于吸水纸上，轻轻拍打从表面去除残留的PBS，必要时可用棉棒轻轻擦拭表皮。将暴露过的组织转移到含有2mL MTT溶液（0.3mg/mL）的培养孔中。培养箱中37℃孵育180 min (±15 min)。

B.2.3 甲臜提取

准备2mL带盖EP管，标记；取出培养篮，用吸水纸将组织吸干；用打孔器取下表皮单位；用平头镊轻轻从胶原基质上取下并分离表皮组织，将表皮和支持胶原一起置于EP管内；在EP管内加入0.5mL 酸性异丙醇；盖紧盖子，防止挥发，混匀，确保所有生物材料浸没于溶剂中；室温避光过夜或4℃下避光保存3天；

B.2.4 读数

甲臜抽提结束后，涡旋混匀，静止2min。如果观察到悬浮可见的细胞或组织片段，则应离心（500r/min）去除，以避免对吸光值造成干扰；从每个EP管吸取2份200μL样品到96孔板中，即2×200μL样品/96孔（每个组织2个孔）；以酸化异丙醇为空白对照，在570nm处读96孔板OD值。

B.2.5 计算各组OD值

空白（酸化异丙醇）：计算平均数，用于背景值校正。

阴性对照（D-PBS）：每个阴性对照组织的OD值减去空白平均值，将3个阴性对照组织的平均OD值确定为100%活性。

阳性对照（5%SDS）：每个阳性组织的OD值减去空白平均值，计算每个组织的平均值。

受试物：每个受试物组织的OD值减去空白平均值，计算每个组织的平均值。

通过与未处理的阴性对照相比，按以下公式计算每个干预表皮的活性百分比。

计算平均相对活性和活性的SD。

计算相对活性的CV。

B.3计算OD值

$OD_{ST}=OD_{ST\ raw}$－平均OD_B

$OD_{NC}=OD_{NC\ raw}$－平均OD_B

$OD_{PC}=OD_{PC\ raw}$－平均OD_B

计算每块组织活性（%）

阳性对照活性（%）=（OD_{PC}/平均OD_{NC}）×100

受试物活性（%）=（OD_{ST}/平均OD_{NC}）×100

计算每组平均活性（%）

平均阳性对照活性（%）=（%PC1+%PC2+%PC3）/3

平均受试物活性（%）=（%ST1+%ST2+%ST3）/3

注：ST为测试组织（substangce tissues）;NC为阴性对照（negative control）；
PC为阳性对照（positive control）；B为空白（black）。

干扰MTT的物质能产生非特异的MTT还原，因此必须计算非特异性的MTT还原值（non specific MTT reduction,NSMTT），并在计活性百分比前将其减去：

NSMTT与阴性对照（活性组织）相比，NSMTT的值应当≤30%。

如果阴性对照（活性组织）相比，NSMTT的值＞30%，需进一步实验或表明该物质不适用于本实验。

将NSMTT转化为真实的MTT（true MTT metabolic conversion，TODST）：

TODST=ODTV－（OD_{KT}－OD_{KU}）

相对活性（%）=（TODST/OD_{NC}）×100

注：TODST为受试物处理组织的真实MTT;
KU为未处理的无活性组织;
KT为受试物处理的无活性组织;
TV为受试物处理的活性组织。

附　录　C 参考物质表

（资料性）

C.1　皮肤刺激性参考物质表

物质	CAS 编号	体内分类	物理状态	GHS类别
非分类物质（GHS，无分类）				
萘乙酸	86-87-3	0	固体	无分类
异丙醇	67-63-0	0.3	液体	无分类
硬脂酸甲酯	112-61-8	1	固体	无分类
丁酸庚酯	5870-93-9	1.7	液体	无分类(可选分类3)[1]
水杨酸已酯	6259-76-3	2	液体	无分类(可选分类3)[1]
皮肤刺激物(GHS 分类2)				
仙客来醛	103-95-7	2.3	液体	分类2
1-溴代己烷	111-25-1	2.7	液体	分类2
氢氧化钾 (5% aq.)	1310-58-	3	液体	分类2
1-甲基-3-苯基-1-哌嗪	5271-27-2	3.3	固体	分类2
庚醛	111-71-7	3.4	液体	分类2

注：[1]根据OECD TG 439，UN GHS可选类别3（轻度刺激物）被视为无类别。

C.2　皮肤腐蚀性参考物质表

物质	CAS编号	化学品类别	基于体内结果全球物质分类	基于体外刺激结果	VRMs的平均细胞活力				物理状态
					VRM1		VRM2		
					3分钟	60分钟	3分钟	60分钟	
1A类体内腐蚀性物质									
溴乙酸	79-08-3	有机酸	1A	(3) 1A	3	2.8	3.2	2.8	固体
二水合三氟化硼	13319-75-01	无机酸	1A	(3) 1A	2.4	4.2	4.4	10.1	液体
苯酚	108-95-2	石碳酸	1A	(3) 1A	29.8	21.8	22.6	13.5	固体
二氯乙酰氯化物	79-36-7	亲电试剂	1A	(3) 1A	5.6	6.3	1.3	1.4	液体
1B 和 1C 子类体内腐蚀性物质的组合									
一水乙醛酸	563-96-2	有机酸	1B 和 1C	(3)1B 和 1C	110.4	22.5	90.4	3.1	固体
乳酸	598-82-3	有机酸	1B 和 1C	(3)1B 和 1C	80.2	9.4	90	3.5	液体
乙醇胺	141-43-5	有机碱	1B	(3)1B 和 1C	66.2	40.3	69.7	9.3	粘性的
盐酸(14.4%)	7647-01-0	无机酸	1B 和 1C	(3)1B 和 1C	69.3	5.7	80.8	9	液体
体内无腐蚀性									
β-溴苯乙烷	103-63-9	亲电试剂	NC	(3) NC	141	117.2	112.5	71.2	液体
4-氨基-1,2,4-三氮唑	584-13-4	有机碱	NC	(3) NC	116.8	120.6	105.7	88.2	固体
4-(甲基巯基)苯甲醛	3446-89-7	亲电试剂	NC	(3) NC	136.7	150.4	85.4	81.6	液体
月桂酸	143-07-7	有机酸	NC	(3) NC	102	117.4	90.7	64.4	固体